



# 2D/3D培養がん細胞に対するNK細胞Killing Assay

## はじめに

近年、創薬開発やがん研究分野においてNK (Natural Killer) 細胞が注目されています。NK細胞は自然免疫で働くリンパ球の一種であり、特に腫瘍細胞やウイルス感染細胞の除去に主要な役割を果たしています。抗体医薬の作用機序のひとつとして知られている抗体依存性細胞傷害 (ADCC) の観点からも、NK細胞が持つ細胞傷害活性は重要です。また、がん免疫分野ではCAR (Chimeric antigen receptor)-NK細胞の開発が進んでおり、CAR-T細胞と比較して高い細胞傷害性と安全性の観点から次世代のがん免疫治療ツールとして期待されています。

通常、免疫細胞による細胞傷害性を評価するKilling Assayは、アイソトープ(51Cr)、ルシフェラーゼ、蛍光染色試薬などを利用しますが、試薬や作業コストの増大に加え、蛍光褪色や細胞ダメージ等の問題があるため、長期間のアッセイには不向きです。

Cell3iMager duos / duos2およびDeep Learningプラグインを使用した明視野解析により、長期間のKilling Assayを行うことができるようになります。プレート固定撮像方式を採用したイメージャーのため、浮遊培養したNK細胞や3D培養したがん細胞であってもクリアに撮像可能です(図1)。本実験では、2D/3D培養したがん細胞に対するNK細胞の細胞傷害性についてラベルフリーイメージング解析を行いました。

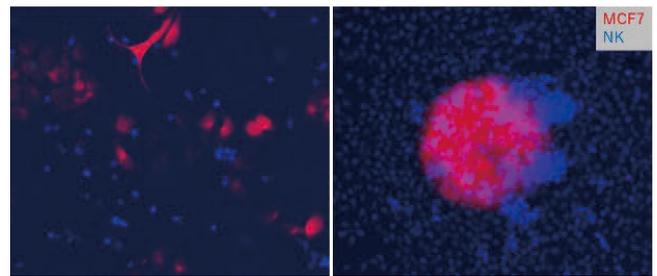


図1 : Cell3iMager duos2で撮像したNK細胞とがん細胞の画像例  
(左) 2D培養 (右) 3D培養

## Materials&Methods

### 使用製品

Cell3iMager duos / duos2  
Deep Learningトレーニングツール  
Deep Learningプラグイン  
Multi Type Objectプラグイン

### 外部ツール

Python(グラフ作成に使用)

### サンプルおよび試薬

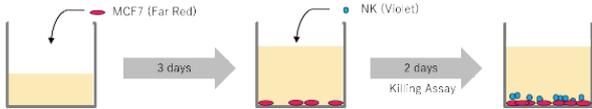
プライマリヒトNK細胞(日本バイオセラピー研究所)  
MCF7細胞株(RIKEN)  
NK細胞培養培地(日本バイオセラピー研究所)  
DMEM(ナカライテスク)  
FBS(Biosera)  
ペニシリン/ストレプトマイシン(ナカライテスク)  
96ウェルプレートF底(CORNING)  
96ウェルプレートU底(CORNING)  
CellTrace Violet(Thermo)  
CellTrace Far Red(Thermo)

CORNINGは、Corning Incorporatedの商標または登録商標です。  
PYTHONは、Python Software Foundationの商標または登録商標です。

方法

CellTrace Far Redで蛍光染色したMCF7細胞を2D/3D培養法で72時間培養した後、CellTrace Violetで蛍光染色したNK細胞と共培養しました(図2)。定期的にインキュベーターから培養プレートを取り出し、Cell3iMager duos / duos2の高倍率レンズを用いて明視野 / 蛍光画像を取得しました(図3)。

2D Killing Assay



3D Killing Assay

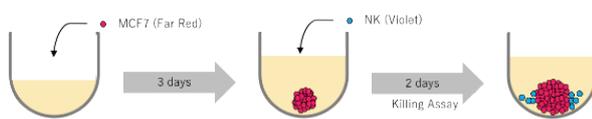


図2 : 2D/3D Killing Assayのフロー

(上) 2D Killing Assay (下) 3D Killing Assay

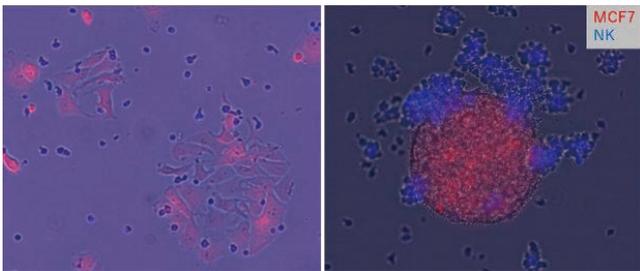


図3 : 明視野と蛍光合成画像

(左) 2D Killing Assay (右) 3D Killing Assay

次に、Deep Learningトレーニングツールを用いて、明視野画像中のMCF7細胞とNK細胞領域をそれぞれラベリングし教師画像を作成しました。明視野画像のラベリング時に蛍光画像を参照することで、明視野画像中のMCF7細胞とNK細胞の区別が容易になります(図4、図5)。

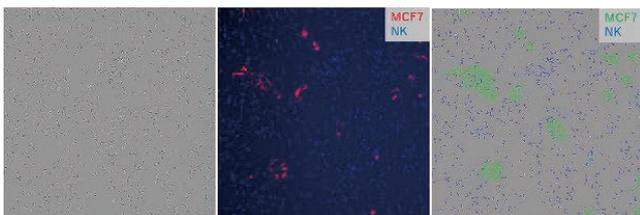


図4 : ラベリング画像の例 (2D)

(左) 明視野画像 (中) 蛍光画像 (右) ラベリングした明視野画像

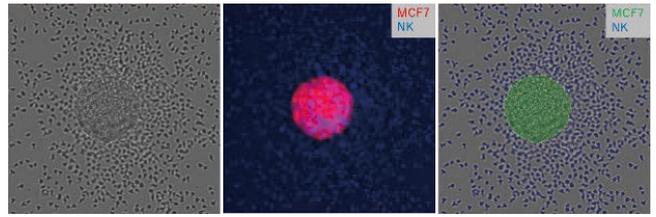


図5 : ラベリング画像の例 (3D)

(左) 明視野画像 (中) 蛍光画像 (右) ラベリングした明視野画像

続いて、作成した教師データセット(明視野画像とラベル画像)を用いて2時間の学習を行うことでディープラーニングのモデルを作成しました。未知の画像に対してモデルを適用することで、明視野画像中のMCF7細胞とNK細胞をそれぞれセグメンテーションし(図6)、セグメンテーション結果から面積値等の特徴量を計測しました(図7)。

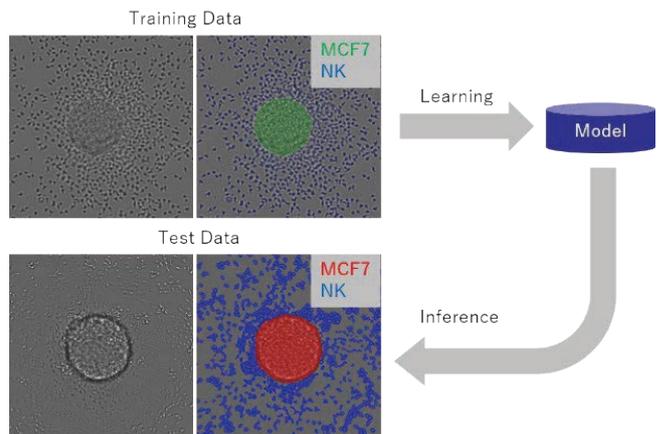


図6 : ディープラーニングのフロー

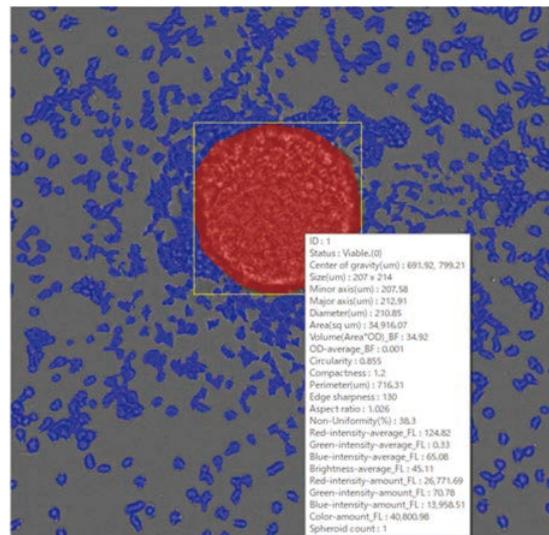


図7 : セグメンテーション結果と計測特徴量

## 結果

### 2D Killing Assay

96ウェルプレートF底にCellTrace Far Redで蛍光染色したMCF7細胞を1,500cells/wellの密度で2D培養し、72時間後にCellTrace Violetで蛍光染色したNK細胞を共培養しました。Effector (NK細胞):Target (MCF7細胞) 比は0:1 ~ 10:1としました。共培養して0、1、3、6、24、48時間後に撮像した明視野画像から、ディープラーニングを用いてMCF7細胞とNK細胞をそれぞれセグメンテーションしました。Multi Type Objectプラグインを用いることで複数細胞種を同時に解析することができます(図8)。セグメンテーション結果からMCF7細胞の面積値を定量することで、NK細胞の細胞数依存的に、かつ経時的にMCF7細胞が減少していることが分かりました(図9)。

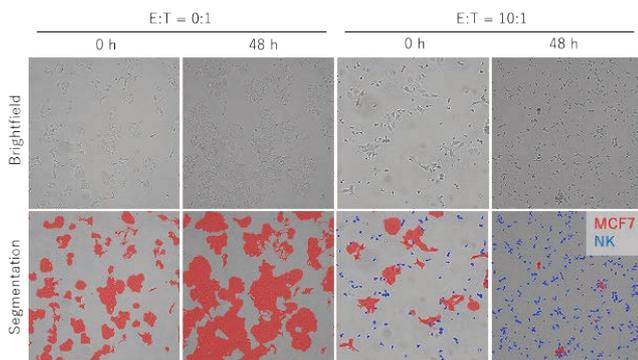


図8：ディープラーニングによるセグメンテーション結果

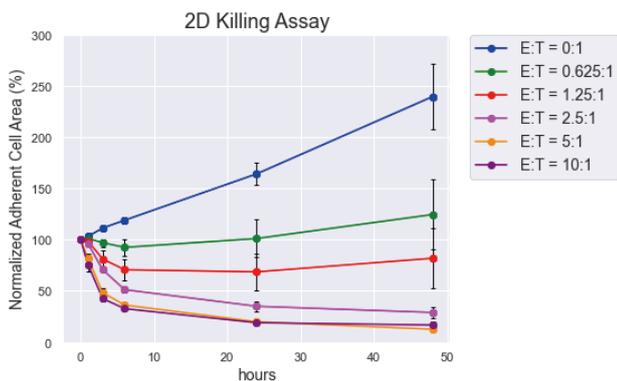


図9：MCF7細胞における面積定量結果

### 3D Killing Assay

96ウェルプレートU底にCellTrace Far Redで蛍光染色したMCF7細胞を300 cells/wellの密度で3D培養し、72時間後にCellTrace Violetで蛍光染色したNK細胞を共培養しました。2D培養時と同様に、Effector (NK細胞):Target (MCF7細胞) 比は0:1 ~ 10:1としました。共培養して0、1、3、6、24、48時間後に撮像した明視野画像から、ディープラーニングを用いて細胞塊領域と細胞塊の周辺領域をセグメンテーションしました。細胞塊周辺に細胞が存在している場合でも、細胞塊領域のみをセグメンテーションすることができました(図10)。

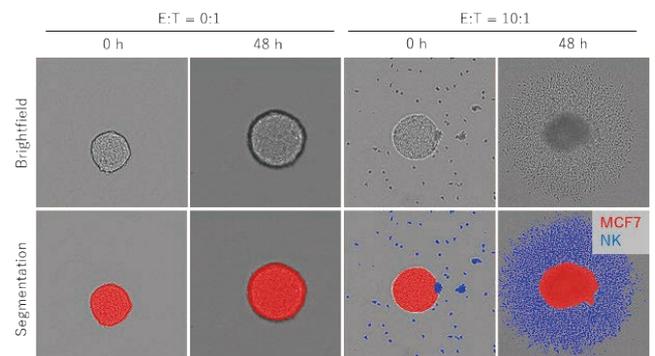


図10：ディープラーニングによるセグメンテーション結果

セグメンテーション画像から細胞塊領域の面積値を定量したところ、NK細胞が存在する場合は細胞塊領域の面積がほとんど増加しないことが分かりました。しかしながら、2D Killing Assayと比較して、NK細胞の細胞数依存的、かつ経時的な変化はほとんど認められませんでした(図11)。その理由として、MCF7細胞が死滅した際に細胞塊が崩壊して水平に広がるため、面積値としては小さくならないと考えられます。

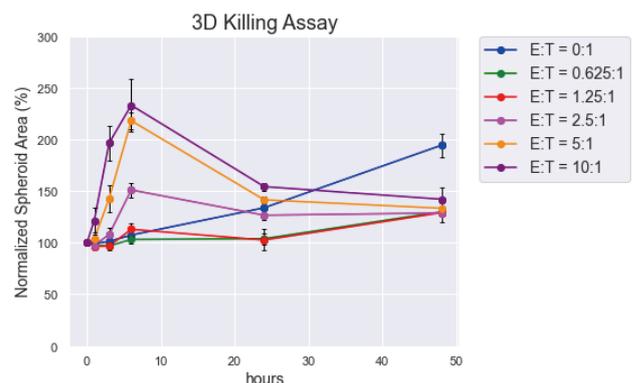


図11：細胞塊領域における面積定量結果

そこで、セグメンテーション画像から細胞塊領域の輝度ムラを定量したところ、細胞数依存的、かつ経時的に輝度ムラが減少することが分かりました(図12、図13)。その理由として、生細胞は細胞膜が存在するため細胞塊の輝度ムラが大きいが、死細胞は細胞膜が崩壊するため、輝度ムラがより均一になる可能性が考えられます。

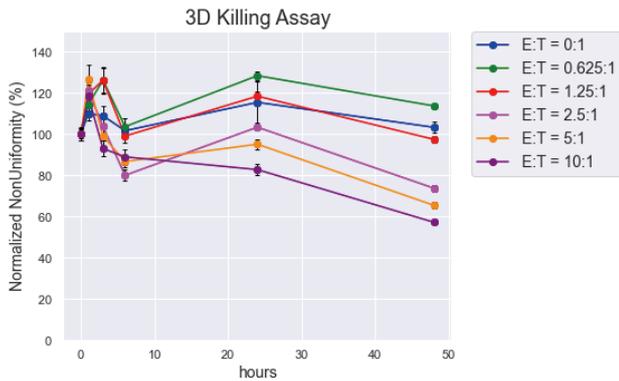


図12：細胞塊領域における輝度ムラ定量結果

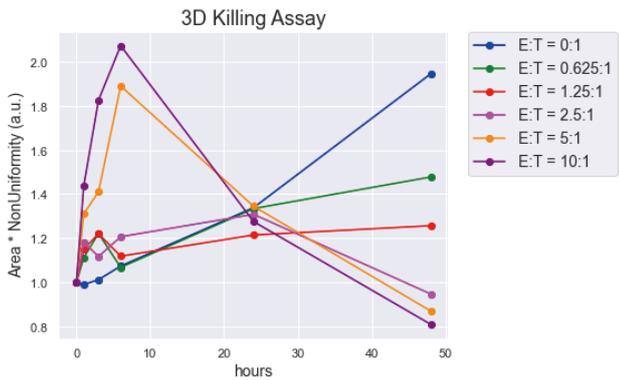


図13：細胞塊領域における輝度ムラ×面積定量結果

## まとめ

Cell3iMager duos / duos2を用いることで2D/3D培養したがん細胞とNK細胞の明視野/蛍光イメージングが可能になります。また、ディープラーニングを用いることで明視野画像中のがん細胞やNK細胞を簡単にセグメンテーションすることができるため、画像処理や機械学習に詳しくないバイオ系研究者の方であっても簡単にラベルフリー解析を行うことができます。プレート固定撮像方式のため、浮遊培養細胞であっても撮像解析が容易です。

これまでフローサイトメトリーや蛍光イメージングで行ってきたKilling Assayをラベルフリーイメージングで代替できる可能性があります。Cell3iMager duos / duos2を用いた非侵襲撮像・解析アプローチは、細胞ダメージ低減や試薬コストの削減につながります。また、長期間のアッセイが可能になることから、3D培養した固形がんに対するCAR-T/CAR-NK細胞のKilling Assayや、抗体医薬のADCCアッセイに応用できる可能性があります。

## 株式会社 SCREENホールディングス

京都(本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る四丁目天神北町1番地の1

### ライフサイエンス事業室

京都(洛西) / 〒612-88486 京都市伏見区羽東師古川町322  
Tel:075-931-7824 Fax:075-931-7826

東京 / 〒135-0044 東京都江東区越中島一丁目2-21 ヤマトネビル7階  
Tel:03-4334-7977 Fax:03-4334-7978

<https://screen-cell3imager.com/>

各種お問い合わせは  
こちらのQRコードから

